

リグニン分解酵素遺伝子導入シロイヌナズナを用いた ダイオキシン類のファイトレメディエーション

*Phytoremediation of dioxins using the transgenic plant,
Arabidopsis thaliana, involving lignin-degradation enzyme genes*

其木茂則, 佐俣哲郎, 堂ヶ崎知格

麻布大学大学院環境保健学研究科

Shigenori Sonoki, Tetsuo Samata, Chikaku Dougasaki

Graduate School of Environmental Health, Azabu University

Abstract: The stability and hydrophobic nature of dioxins make them a persistent environmental hazard, so the environmental pollution level of such compounds is becoming more serious. To clean up the polluted environment, phytoremediation with plants, which have varied metabolic systems, is expected to solve the environmental pollution problem.

In this study, the accumulation of 11 congeners of coplanar polychlorinated biphenyl (Co-PCBs) by *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) was investigated, using high-resolution GC-MS.

As the results, it was found that the accumulation levels of Co-PCBs by *A. thaliana* under the water culture depended on the content or position of chlorine as below.

1. Lower chlorinated Co-PCB congeners were accumulated more than higher chlorinated ones.
2. Non-ortho Co-PCB congeners were less accumulated than equally chlorinated ortho congeners.
3. Accumulation of lower chlorinated Co-PCB congeners were proportionally increased in proportion to the exposure levels of Co-PCBs, to the contrary, accumulation of higher chlorinated Co-PCBs were not increased.
4. Absorption through the roots and absorption (or adsorption) from air depended on solubility and vapor pressure.

目 的

現在, 我々をとりまく環境中には数多くの化学物質が存在し, 特に生体に有害な化学物質による環境汚染が大きな問題となっている。その中でも極めて高い毒性を持ち, 環境ホルモン作用を示すとされているダイオキシン類 (PCDDs, PCDFs およびコプラナー PCBs) は化学的に安定した構造を持ち, 環境中に低濃度ながら長期にわたり広く拡散しており, そ

の環境からの除去が急務となっている (1-3)。ダイオキシン類による環境汚染を修復する方法に微生物を用いたバイオレメディエーションが挙げられる。特に担子菌類に属する白色腐朽菌は, 木質主成分であるリグニンを酵素的に酸化分解する系が知られており, この系を応用したダイオキシン類の生分解が広く検討されている (4)。しかし微生物の生育は周囲の物理的条件や化学的条件に大きく左右され, またバイオマス量も小さいため効率の良い環境修復と

いう点において、いくつかの欠点がある。そこで近年植物を用いた環境浄化（ファイトレメディエーション）が注目されてきている。植物は微生物に比べ生育に特別な条件を必要とせず、バイオマス量も比較的大きく、従来の化学的処理や物理的処理と比較して処理コストは大幅に削減でき、低濃度で広範囲にわたる汚染サイトでも効果的に処理できるとされている（5）。そこで本研究ではモデル植物としてシロイヌナズナを用い、白色腐朽菌の産生するリグニン分解酵素遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナを新規に創製し、これを用いたダイオキシン類のファイトレメディエーションを究極目標とする。そこで今年度は高分解能ガスクロマトグラフ/質量分析計を用い、ダイオキシン類の中でも特に毒性が高く、かつ欧米に比べ高い汚染濃度が問題になっているCo-PCBsをターゲットにして、シロイヌナズナによるダイオキシン類の異性体ごとの吸収性について詳細に検討した。

方 法

2-1 試薬

四塩化ビフェニール（TCB）として3,3',4,4'-TCB（# 77）、及び3,4,4',5-TCB（# 81）、五塩化ビフェニール（PeCB）として2,3,4,4',5-PeCB（# 105）、2,3,3',4,4'-PeCB（# 114）、2,3',4,4',5-PeCB（# 118）、2,3,4,4',5-PeCB（# 123）、及び3,3',4,4',5-PeCB（# 126）、六塩化ビフェニール（HxCB）として2,3,3',4,4',5-HxCB（# 156）、2,3',4,4',5'-HxCB（# 167）、及び3,3',4,4',5,5'-HxCB（# 169）、七塩化ビフェニール（HpCB）として2,3,3',4,4',5,5'-HpCB（# 189）の11種類のCo-PCBsを用いた。Co-PCDsの2,2',6,6'位に塩素が置換していないPCBsを特にノンオルトCo-PCBsと呼ぶ。括弧内の数字はIUPAC No.を表した。11種類のCo-PCBsはそれぞれ500 µg/mlのノナン溶液でストックされており、これらをそれぞれ5 µg/mlになるよう11種類を合わせ、トルエンで希釈しものをCo-PCBsの標準溶液とした。さらにCo-PCBs標準溶液をジメチルスホキシド（DMSO）で希釈し500 ng/mlにしたものを添加用Co-PCBs溶液とし、この添加用Co-PCBs溶液を蒸留水で希釈し植物に添加した。内標はクリーンアップスパイク用、シリンジスパイク用の2種類を用いた。

クリーンアップスパイクにはTCB定量用に ^{13}C にマストラベルされた# 77 (^{13}C -TCB)を、PeCB, HxCB, 及びHpCB定量用に ^{13}C にマストラベルされた# 126 (^{13}C -PeCB)を用い、これら2種類を1つに合わせ各60 µg/mlになるよう20%トルエン含有DMSO溶液で希釈した溶液を内標溶液とした。シリンジスパイクには ^{13}C にマストラベルされた# 169 (^{13}C -HxCB)を用い、トルエンで3 µg/mlの濃度にしたものをシリンジスパイク用溶液とした。

2-2 シロイヌナズナ

植物はシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) コロンビア株を用いた。ロックウールにシロイヌナズナを播種し、26℃のもとで明期16時間、暗期8時間の条件のグロースキャビネット内で水耕栽培を行った。播種後約1ヶ月のシロイヌナズナをCo-PCBsの暴露実験に用いた。

2-3 水耕栽培でのCo-PCBsの根からの吸収

2-1で調製したCo-PCBs水溶液を0.05 ng/ml, 0.2 ng/ml および0.5 ng/mlの3段階に調製し、その濃度段階ごと別々のデシケータ内のガラス製のシャーレに25 ml ずつ入れたものをそれぞれ低濃度条件、中濃度条件のサンプルとした。それらのシャーレにロックウールで水耕栽培させたシロイヌナズナを3個体入れ1週間生育させた。植物体中のCo-PCBs含量の測定はロックウールと直接接していない植物体の地上部から行った。

2-4 水耕栽培における大気からのCo-PCBs吸収および吸着量

0.5 ng/mlに調製したCo-PCBs水溶液を25 ml 入れたシャーレをデシケータの底に置き、その上に蒸留水が25 ml 入ったシャーレを置き、そこにロックウールで水耕栽培させたシロイヌナズナ3個体を置いた。2週間後Co-PCBs水溶液とは直接接触していない植物体地上部からCo-PCBs含量を測定し、大気からの吸収（吸着）量とした。

2-5 GC-MS分析のための試料の調製

植物3個体の地上部を刈り取り湿潤重量を量る。この植物を乳鉢に入れ内標溶液を1サンプルあたり100 µl 添加し、液体窒素で凍結しながら粉碎した。粉碎された植物に終濃度1 mol/l となるように水酸化カリウムのエタノール溶液を加え1晩振盪させた後、ヘキサン抽出を行った。ヘキサン層を硫酸洗浄、脱

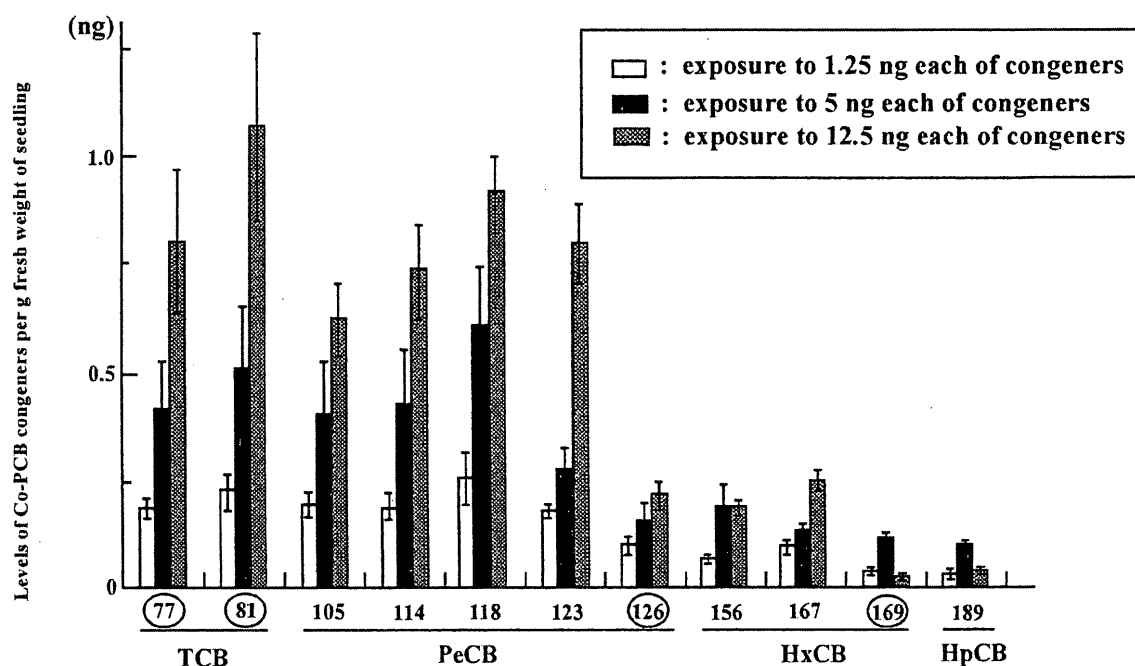


Fig.1 Effect of exposure levels of Co-PCBs on the accumulation by *Arabidopsis thaliana*. Seedlings were exposed to each level of Co-PCB congeners for 7 days. Each congener is indicated with the IUPAC number, and open circled IUPAC numbers reveal non-ortho Co-PCBs. Each bar represents the mean and the standard deviation of five determinations.

水、濃縮後、アルミナ/シリカゲルカラムクロマトグラフィーで Co-PCBs を分画した。得られた溶液を KD 濃縮器で約 80 μ l まで濃縮した。この濃縮液をあらかじめシリジンスパイク用溶液 2 μ l を添加したバイアル管に入った 100 μ l ガラスインサートにトルエンで洗い流しながら移し、これを GC-MS 用のサンプルとした。

2-6 GC-MS 分析条件

使用したガスクロマトグラフィー (GC) は Hewlett Packard 社 HP6890 を用いた。カラムは SPB-5 (30 m/Supelco) を用い、注入分はスプリットレス法、注入口温度 250 $^{\circ}$ C、カラムオープン昇温 80 $^{\circ}$ C (2 分)、30 $^{\circ}$ C/分で 200 $^{\circ}$ C まで上げ、3 $^{\circ}$ C/分で 230 $^{\circ}$ C まで上げ、10 $^{\circ}$ C/分で 260 まで上げた。キャリアガスには高純度ヘリウムを用いた。質量分析計 (MS) は日本電子株式会社の MStation JMS-700 を用いた。分解能を 10,000、イオン源温度 280 $^{\circ}$ C、イオン化エネルギー 45eV、質量校正用標準物質を Perfluorokerosene (PFK) を用い、選択イオン検出法 (SIM) によるロックマス法により Co-PCBs を定量した。

SIM モニター質量は TCB, PeCB, HxCB, HpCB でそれぞれ 291.9194, 325.8804, 359.8415, 393.8025 と

した。また内標の SIM モニター質量は 13 C-TCB, 13 C-PeCB, 13 C-HxCB でそれぞれ 303.9792, 337.9207, 371.8817 とした。さらにロックマスには PFK を用い SIM モニター質量は TCB, PeCB 定量用で 330.9792 とし、HxCB, 及び HpCB 定量用は 380.9760 とした。

結果と考察

3-1 水耕栽培での Co-PCBs の根からの吸収

低濃度、中濃度、高濃度のどの条件においても、低塩素の同族体の方が吸収量は高くなり、同塩素数の Co-PCBs の中ではノンオルトの Co-PCBs はモノオルト体に比べ吸収量が低くなった (Fig.1)。また TCB, 及び PeCB では暴露量の増加に従ってシロイヌナズナによる吸収量も飛躍的に増えていくのに対して、HxCB, HpCB では暴露量が増加しても吸収量に変化は見られなかった (Fig.1)。25 $^{\circ}$ C における Co-PCBs の水への溶解度は TCB の # 77, 及び # 81 はそれぞれ 2.70 ng/ml, 及び 3.13 ng/ml, PeCB の # 105, # 114, # 118, # 123, 及び # 126 はそれぞれ 1.66ng/ml, 2.63ng/ml, 2.07ng/ml, 0.899ng/ml, 及び 1.33ng/ml, HxCB の # 156, # 167, 及び # 169 はそれぞれ 1.10ng/ml, 1.07ng/ml, 及び 0.130ng/ml,

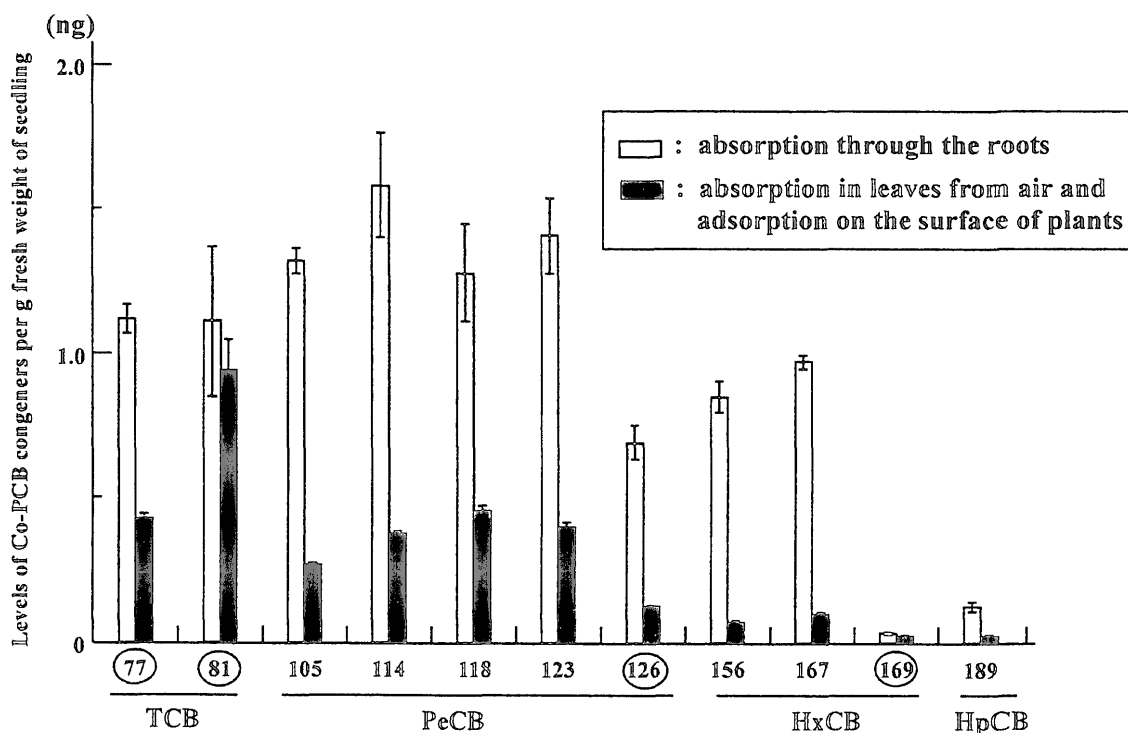


Fig.2 Accumulation of Co-PCBs by *Arabidopsis thaliana* through the roots or from air Seedlings were exposed to 12.5 ng each of Co-PCB congeners for 14 days. Details as in Fig.1.

HpCBの#189は0.063ng/mlとなっている(6)。Co-PCBsの溶解度は塩素数の増加に従い減少しており、ノンオルトのCo-PCBsは同塩素のCo-PCBsと比較して溶解度がやや低い。このことは植物によるCo-PCBs同族体の根からの吸収量の違いがCo-PCBsの水への溶解度に強く関連していることが示唆される。

3-2 水耕栽培における大気からのCo-PCBsの吸収および吸着量

大気からの吸収(吸着)量においても水耕栽培における根からの吸収傾向と同じ結果が得られた(Fig.2)。大気からのCo-PCBsの吸収量には、葉を介して植物体に吸収される量と、葉の表面に吸着している量の2種類が考えられる(7)。吸収量と吸着量を独立して測定するのは大変困難で、まだそういった報告はされていない。またPCBsの混合製品であるAroclorの蒸気圧は塩素数の増加に従って減少するので、Co-PCBsの大気からの吸収(吸着)量は蒸気圧に関係していると思われる(8)。

要約

Co-PCBsのシロイヌナズナによる吸収、吸着について高分解能GC-MSを用いて詳細に検討したところ以下のような知見が得られた。

- ・ Co-PCBsは低塩素同族体に比べ高塩素体の方が(吸着)量は低下する。
- ・ モノオルトCo-PCBsはノンオルト体と比較して吸収量が高くなる。
- ・ 暴露濃度が高くなるに従って低塩素Co-PCBsの吸収量は飛躍的に増加するのに対して、高塩素Co-PCBsの吸収量は変化しない。
- ・ Co-PCBsの水への溶解度及び蒸気圧は塩素数の増加に伴い低くなり、ノンオルトCo-PCBsは同塩素数のCo-PCBsと比較して低くなることから、シロイヌナズナの根及び大気からの吸収量は溶解度及び蒸気圧に依存する。

文献

- 1) Kurokawa, Y., Matsueda, T., Nakamura, M., Takada, S., Fukamachi, K., Chemosphere 32, 491-500 (1996).

- 2) Ohsaki, Y., Matsueda, T., Kurokawa, Y., *Environmental pollution* 96, 79-88 (1997).
- 3) Soong, D. K., Ling, Y. C., *Chemosphere* 34, 1579-1586 (1997).
- 4) Lee, A.B., Stephen, D., Phillip, M.F., Owen, P.W., Michael A.P., *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2020-2025 (1998).
- 5) Macek, T., Mackova, M., Kas, J., *Biotechnology Advances* 18, 23-34 (2000).
- 6) Qingdong, H., Chia, S.H., *Water Research* 36, 3543-3552 (2002)
- 7) Asai, K., Takage, K., Shimokawa, M., Sue, T., Hibi, A., Hiruta, T., Fujihiro, S., Nagasaka, H., Hisamatsu, S., Sonoki, S., *Environmental pollution* 120, 509 - 511 (2002)
- 8) William, T. Foreman., Terry, F. Bidleman., *Journal of chromatography A.* 330, 203-210 (1985)